

ทบทวนอนุกรมวิธานของเฟิร์นชนิดเชิงซ้อน *Microsorium punctatum* (L.) Copel.

(POLYPODIACEAE)

นายสหณัฐ เพชรศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TAXONOMIC REVISION OF FERN *Microsorium punctatum* (L.) Copel. COMPLEX
(POLYPODIACEAE)

Mr. Sahanat Petchsri

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biological Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University


Academic year 2007

Copyright of Chulalongkorn University


591107

Thesis Title TAXONOMIC REVISION OF FERN *Microsorium punctatum* (L.)
Copel. COMPLEX (POLYPODIACEAE)
By Mr. Sahanat Petchsri
Field of Study Biological Science
Thesis Advisor Professor Thaweesakdi Boonkerd, Ph.D.
Thesis Co-advisor Bernard R. Baum, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree



.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Preeda Boon-Long, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Professor Thaweesakdi Boonkerd, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Bernard R. Baum, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Wina Meckvichai)


.....Member
(Manit Kidyoo, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Kitichate Sridith, Ph.D.)

สหณัฐ เพชรศรี : ทบทวนอนุกรมวิธานของเฟิร์นชนิดเชิงซ้อน *Microsorium punctatum* (L.) Copel. (Taxonomic revision of fern *Microsorium punctatum* (L.) Copel. complex (POLYPODIACEAE)) อ. ที่ปรึกษา: ศ.ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ดร. Bernard R. Baum, 114 หน้า.

“กระปรอกหางสิงห์ (*Microsorium punctatum* (L.) Copel.)” เป็นเฟิร์นที่เจริญตามธรรมชาติ ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลในป่าชายเลนไปจนถึงบริเวณภูเขาสูงกว่า 2,800 เมตร กระจายพันธุ์อยู่ในเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน มีสถานภาพทางอนุกรมวิธานไม่เสถียรและมีความแปรผันสูงในลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งไม่สอดคล้องกับระบบการจัดจำแนกที่มีมาก่อน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาทบทวนเพิ่มเติม จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งของเฟิร์น *M. punctatum* (L.) Copel. และชนิดใกล้เคียงจำนวน มากกว่า 1,500 ตัวอย่างพบว่าสามารถจัดจำแนกเฟิร์นกลุ่มนี้ออกได้ เป็น 8 หน่วยอนุกรมวิธาน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งจำนวน 707 ตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศด้วยเทคนิคทางอนุกรมวิธานเชิงตัวเลขในลักษณะเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพรวมทั้งสิ้น 58 ลักษณะ โดยพบว่าการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster analysis) นั้นสามารถแบ่งตัวอย่างพันธุ์ไม้ทั้งหมดออกเป็น 8 กลุ่มเช่นกัน ในขณะที่การวิเคราะห์การจัดจำแนก (Discriminant analysis) นั้นพบว่าแต่ละกลุ่มจาก 8 กลุ่มตามข้างต้นนี้ได้แยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดยสามารถสรุปได้ว่ามีพรรณไม้ที่ควรจัดเป็นชนิดอิสระจากชนิดอื่นๆ ตามผลการวิเคราะห์ในครั้งนี้คือ *M. siamense*, *M. thailandicum* และ *M. membranaceum*, *M. musifolium*, *M. glossophyllum* และ *M. punctatum* ส่วนที่ควรจัดจำแนกให้เป็นระดับพันธุ์คือ *M. steerei* var. *steerei* and *M. steerei* var. *whiteheadii* โดยมีลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก 6 ลักษณะคือ ความยาวของก้านใบ ความยาวของเกล็ดบริเวณไรโซม ความกว้างของ primary areole จำนวนแถวของกลุ่มอับสปอร์ เส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มอับสปอร์ และความหนาแน่นของกลุ่มอับสปอร์บนแผ่นใบ จากนั้นจะนำทั้งลักษณะเชิงปริมาณและลักษณะเชิงคุณภาพมาใช้ในการสร้างรูปวิธานแยกเฟิร์นกลุ่มนี้ต่อไป อีกทั้งจากผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RAPD ยังพบว่าสมควรให้คงการจัดจำแนกในระดับพันธุ์ปลูกเอาไว้ 2 พันธุ์ด้วยคือ *M. punctatum* cv. *serratum* และ *M. punctatum* cv. *grandiceps* ส่วนผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการนั้นพบว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาต่างๆ ข้างต้นในการแยก *M. glossophyllum* และ *M. musifolium* ออกจาก *M. punctatum* โดยมีสายวิวัฒนาการ *M. membranaceum* และ *M. musifolium* เป็นสายวิวัฒนาการสายแรกที่แยกออกมา ส่วนชนิดอื่นๆที่เหลือต่อมาจึงแยกย่อยและมีสายวิวัฒนาการใหญ่ๆ 4 สาย

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต..... *ศุภมาส 1501575*
ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Dr. Baum*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *B. Baum*

4673833123 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCE

KEY WORD : SYSTEMATIC/NUMERICAL TAXONOMY/MORPHOMETRIC ANALYSIS/*Microsorium punctatum*

SAHANAT PETCHSRI : TAXONOMIC REVISION OF FERN *Microsorium punctatum* (L.) Copel. COMPLEX (POLYPODIACEAE). THESIS ADVISOR : PROF. THAWEESAKDI BOONKERD, Ph.D., THESIS COADVISOR : BERNARD R. BAUM, Ph.D. 114pp.

Microsorium punctatum (L.) Copel. is a widespread and variable species of fern. It is found from sea level to about 2,800 m altitude and has its distribution in the palaeotropics and subtropics. At present, the taxonomic status and boundary of this species is still uncertain due to the great variation in many characters. This variation does not match with previous systematic treatments. So, a number of species were grouped under a proposed species complex worth investigating. In order to investigate this species complex, more than 1,500 specimens were studied. Based on morphological and anatomical characters, *M. punctatum* complex can be divided into 8 taxa. This result rather corresponded with the results of cluster analysis and canonical discriminant analysis performed on 707 herbarium specimens deposited at BCU, BKF, BM, K, B, L and P. Twenty three quantitative and 35 qualitative characters were employed. Cluster analysis revealed the separation of the taxa in the species complex into eight groups. The eight-cluster grouping is discussed. From a canonical discriminant analysis using the eight-cluster grouping as priori groups, it can be concluded that *M. siamense*, *M. thailandicum*, *M. membranaceum*, *M. glossophyllum* and *M. musifolium* are distinct taxa, while specimens of *M. steerei* and *M. whiteheadii* were mixed together and should be proposed as one and the same species. Likewise, the other 10 synonyms of *M. punctatum* are not distinct from *M. punctatum* and treated here as members of *M. punctatum*. The six most important characters that separate the eight recognized species are stipe length, number of sori row between the adjacent secondary vein, sori diameter, sori density, primary-areole width, and spore width. These quantitative characters, together with some qualitative characters, were useful in constructing an identification key to these species. The differentiation between the studied taxa is discussed. According to RAPD data, *M. punctatum* cv. *serratum* and *M. punctatum* cv. *grandiceps*, were still recognized. The result of phylogenic study agreed with morphological and morphometric studies to separate *M. glossophyllum* and *M. musifolium* from *M. punctatum*. *M. membranaceum* and *M. musifolium* were most basal position of monophyletic clade of the complex. The larger clade was divided into four recognizable subclades.

Field of study.....Biological Science.....Student's signature.....

Academic year.....2007.....Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Sahanat Petchsri

Thaweesakdi Boonkerd

B. Baum

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my thesis advisors, Professor Dr. Thaweesakdi Boonkerd, for his assistance in the thesis's problem, guidance, encouragement and many valuable suggestions, which has a great benefit throughout my study.

I also would like to express my sincere thanks to my thesis co-advisor, Dr. Bernard R. Baum, for his helpful advice and criticism, especially in molecular and numerical techniques, throughout the course of this study.

I wish to express my sincere thanks to the thesis committee, Associate Professor Dr. Preeda Boon-Long, Associate Professor Wina Meckvichai, Associate Professor Dr. Kitichate Sridith, Dr. Manit Kidyue and Assistant Professor Dr. Tosak Seelanan for their valuable suggestions and advice.

I also wish to thank Mr. Yotsawate Sirichamorn, Miss Maliwan Nakkuntod, Miss Thanikarn Udomchalothorn, Miss Paweena Traiperm, Miss Oratai Neamsuvan, and Miss Apirada Sthapattayanon for their friendship and their helps during my field observations and my laboratory. Thanks are also due to all staff, the directors and curators of B, BCU, BKF, BM, K, L and P herbarium for their generous help and making their collections available for this study.

Thanks to Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, the Plant of Thailand Research Unit, and Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada for providing laboratory facilities for this thesis.

Special appreciation goes to my family for their supports and encouragement throughout the study period.

This project was supported by the Thai government budget 2005, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University; Chulalongkorn University graduate scholarship to commemorate the 72nd anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej and the TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training program (grant No. T_145007).

CONTENTS

	Page
Thai Abstract	iv
English Abstract	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
List of Tables	ix
List of Figures	x
List of Abbreviation	xi
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Literature Review	
Taxonomic History of the “ <i>Microsorium punctatum</i> (L.) Copel. complex”	2
Methodological review	5
Chapter 3 Morphological and Anatomical Studies	
Introduction	11
Materials and Methods	12
Results	15
Discussion and Conclusion	39
Chapter 4 Numerical Study	
Introduction	42
Materials and Methods	43
Results and Discussion	46
Conclusion	55
Chapter 5 PCR-RAPD Study	
Introduction	56
Materials and Methods	57
Results	61
Discussion and Conclusion	70
Chapter 6 Phylogenetic Study	
Introduction	73
Materials and Methods	73
Results	78
Discussion and Conclusion	84

Chapter 7 General Conclusion	86
References	103
Appendix	109
Biography	114

LIST OF TABLES

Table	Page
3.1 List of the 21 taxa of the <i>Microsorium punctatum</i> (L.) Copel. complex in this present study	13
3.2 Comparison of 35 qualitative characters of the eight clustering groupings	25
4.1 Herbarium which deposited specimen that used in this study of the <i>M. punctatum</i> (L.) Copel. complex	44
4.2 Twenty three quantitative characters, with their methods of scoring used in this study of the <i>M. punctatum</i> (L.) Copel. complex	50
4.3 Classification Function Coefficients of eight clustering groups obtained from cluster analysis based on 19 quantitative characters	53
4.4 Means and standard deviation of 23 quantitative characters of the eight clustering groupings of the <i>M. punctatum</i> (L.) Copel. complex	110
4.5 Summary of canonical discriminant function of eight clustering groups based on 23 quantitative characters	111
4.6 Summary of canonical discriminant function of 21 taxa based on 23 quantitative characters	112
4.7 Cross-validation summary with the linear discriminant function of the <i>M. punctatum</i> complex	113
5.1 Sampling sites and numbers of DNA samples of <i>M. punctatum</i> complex and outgroup taxa used in RAPD analysis	59
5.2 Twenty one RAPD primers, primer sequences and numbers of amplified loci per primer	60
5.3 Number and percentage of DNA polymorphism in the <i>M. punctatum</i> complex	62

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.2 Habitats of the <i>M. punctatum</i> complex	3
3.1 Herbarium Specimen of the <i>M. punctatum</i> complex	14
3.2 Rhizome and scale of the <i>M. punctatum</i> complex	16
3.3 Stipe and rachis of the <i>M. punctatum</i> complex	18
3.4 Stomata of the <i>M. punctatum</i> complex	20
3.5 Sori distribution patterns of the <i>M. punctatum</i> complex	22
3.6 Spore of the <i>M. punctatum</i> complex	23
3.7 Spore of the <i>M. punctatum</i> complex	24
4.1 Measurement of rhizome, scale and frond part	45
4.2 UPGMA clustering of 707 OTUs based on Gower Similarity Coefficient calculated between means of only 23 qualitative characters of <i>M. punctatum</i> (L.) Copel. complex	47
4.3 UPGMA clustering of 707 OTUs based on Gower Similarity Coefficient calculated between means of 23 qualitative and 33 quantitative characters of <i>M.</i> <i>punctatum</i> (L.) Copel. complex	48
4.4 The ordination of 707 herbarium specimens of the <i>M. punctatum</i> (L.) Copel. complex	52
4.5 Boxplots of the six most important characters of the <i>M. punctatum</i> (L.) Copel complex	54
5.1 Examples of RAPD band profiles of the <i>M. punctatum</i> complex operated by primer OPS-20	68
5.2 Dendrogram of 41 individuals of the <i>M. punctatum</i> complex generated by cluster analysis using UPGMA based on RAPD	69
6.1 The first two topologies of the consensus trees of “the <i>M. punctatum</i> complex” base on morphological characters.....	80
6.2 The last two topologies of the consensus trees of “the <i>M. punctatum</i> complex” base on morphological characters	81
6.3 The majority rule consensus tree of “the <i>M. punctatum</i> complex” base on morphological characters	82
6.4 The strict consensus tree of “the <i>M. punctatum</i> complex” base on morphological characters	83

LIST OF ABBREVIATION

A, T, C, G	=	Nucleotide containing the base Adenine, Thymine, Cytosine, and Guanine, respectively
AC	=	costal areole
ALA	=	Angle of frond apex
ALB	=	Angle of frond base
APS	=	Angle between primary and secondary vein
BCU	=	Professor Kasin Suvatabhundu Herbarium, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University
BKF	=	National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok, Thailand
B	=	The Botanical Museum Berlin-Dahlem, Berlin, Germany
BM	=	The Natural History Museum, London, England
°C	=	Degree Celsius
cm	=	Centimeter
cv.	=	<i>cultivarietas</i> , cultivar variety
comb. nov.	=	<i>combinatio</i> , new combination of name and epithet
CTAB	=	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DBSV	=	Distance between closest secondary vein in mm
diam	=	in diameter
DSL	=	Density of sori per cm ²
DSO	=	Diameter of sori in mm
DSR	=	Diameter of sporangium in mm
e.g.	=	<i>example gratia</i> , by way of example, for example
mm	=	Millimeter
g	=	gram
K	=	Kew Herbarium, Royal Botanic Gardens, England
kb	=	kilobase pair
L	=	The Rijkherbarium, Leiden, Nederland
LMW	=	Lamina width in mm
LML	=	Lamina length in mm
M	=	Molar

m	=	meter
mg	=	Milligram
MgCl ₂	=	Magnesium Chloride
mM	=	Millimolar
ml	=	milliliter
NAC	=	Number of annulus cell
NaCl	=	Sodium chloride
ng	=	Nanogram
NSR	=	Number of sori rows between closest secondary vein
n.v.	=	<i>non visus</i> , not seen
OTU	=	Operational Taxonomic Unit
P	=	Muséum National d'Historie Naturelle, Paris, France
PAW	=	Primary areole width in mm
PCR	=	Polymerase chain reaction
PDL	=	Phyllopodia length in mm
PHS	=	Distance between highest sori and frond apex in mm
PLS	=	Distance between lowest sori and frond base in mm
RAPD	=	Random Amplification of Polymorphic DNA
RDL	=	Distance between closest phyllopodia in mm
RHD	=	Rhizome diameter in mm
rpm	=	Revolution per minute
SCL	=	Scale length in mm
SCW	=	Scale width in mm
SEM	=	Scanning electron microscope
s. l.	=	sensu lato
s.n.	=	<i>sine numero</i> , without a number, unnumbered
SPL	=	Spore length in mm
SPW	=	Spore width in mm
s. str.	=	sensu stricto
stat. nov.	=	<i>status novus</i> , new rank
STL	=	Stipe length in mm
STD	=	Stipe diameter in mm
subg.	=	Subgenus

subsect.	=	Subsection
ssp.	=	Subspecies
Tris	=	Tris (hydroxyl methyl) aminomethane
UPGMA	=	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
µg	=	Microgram
µl	=	Microlitre
µm	=	Micrometer
V	=	Volt
var.	=	Variety